

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11 Veröffentlichungsnummer:

0 051 852
A1

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 81109501.7

22 Anmeldetag: 04.11.81

51 Int. Cl.³: **C 07 D 513/04, A 61 K 31/54,**
A 61 K 31/18, A 61 K 31/505
// (C07D513/04, 277/00, 239/00)

30 Priorität: 08.11.80 DE 3042187

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 19.05.82
Patentblatt 82/20

84 Benannte Vertragsstaaten: FR GB IT NL SE

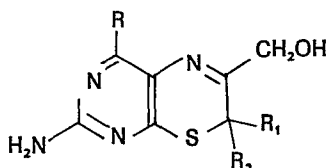
71 Anmelder: **Stiftung Forschungsinstitut Borstel,**
Parkallee 1-40, D-2061 Borstel (DE)

72 Erfinder: **Seydel, Joachim Karl, Prof. Dr., Mülch 2,**
D-2061 Borstel (DE)
Erfinder: **Visser, Klaus, Parkallee, D-2061 Borstel (DE)**

74 Vertreter: **Scholz, Herbert, Dr., Feldkamp 8,**
D-2000 Hamburg 67 (DE)

54 **Pyrimido(4,5b)(1,4)thiazine und Verfahren zu ihrer Herstellung.**

57 Die vorliegende Erfindung betrifft 7H-Pyrimido[4,5b]-[1,4]thiazine der Formel I,



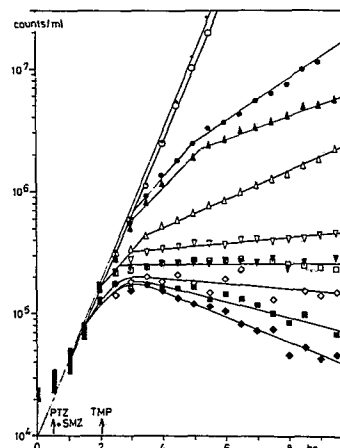
R = NH₂, OH
R₁; R₂ = H, Alkyl

die durch Cyclisierung aus den entsprechenden Pyrimidinen und α -Halogenketonen erhalten werden.

Diese Verbindungen inhibieren die «de novo»-Biosynthese der Folsäure in Mikroorganismen und hemmen dadurch deren Wachstum. Sie können deshalb in pharmakologischen, klinischen und diagnostischen Untersuchungen, die die Eigenschaften von Bakterien betreffen, eingesetzt werden. Als Bakteriostatika vermindern diese Verbindungen die Vermehrungsgeschwindigkeit von Mikroorganismen bei einer Konzentration von $\geq 100 \mu\text{mol/l}$.

Darüber hinaus wirken Kombinationen dieser Substanzen mit Sulfonamiden und/oder Dihydrofolsäurereduktasehemmern vom Typ des 2,4-Diamino-5-(3',4',5'-trimethoxybenzyl)-pyrimidins (TMP) durch sequentielle Blockade zweier Enzyme synergistisch, was durch Bakterienvermehrungskinetik gezeigt werden kann.

Diese wechselseitige Potenzierung der Wirkung einzelner Hemmstoffe verzögert die Resistenzentwicklung von Mikroorganismen und erweitert das Spektrum der antimikrobiellen Wirkung dieser Kombination, da auch Organismen, die nur gering gegen die einzelnen Substanzen empfindlich sind, durch die Kombination in ihrem Wachstum stark gehemmt werden können.



EP 0 051 852 A1

Anm.: Forschungsinstitut Borstel, Institut für
Experimentelle Biologie, 2061 Borstel

Pyrimido[4,5b][1,4]thiazine und Verfahren
zu ihrer Herstellung.

Die Erfindung betrifft neue Verbindungen sowie Kombinationen mit diesen Verbindungen und ihre Herstellung bspw. zur Behandlung von Mikrobeninfektionen.

Die neuen Verbindungen haben die allgemeine Formel (I) -Figur 1 der Zeichnung- oder eine tautomere Form derselben, worin R eine Amino- oder Hydroxygruppe und die Reste R_1 und R_2 gleich oder verschieden und jeder dieser beiden Reste unabhängig voneinander eine Niedrigalkylgruppe oder Wasserstoff ist.

Es wurde gefunden, daß die neuen Verbindungen bzw. ihre Derivate oder Salze als Antagonisten des mikrobiellen Metabolismus vorteilhaft brauchbar sind.

Die gefundenen Verbindungen der Formel (I) können nach der vorliegenden Erfindung wie folgt hergestellt werden (s. Formelschema nach Fig. 1): Man setzt eine Verbindung der Formel (II) mit einer Verbindung der Formel (III) um, wobei Hal ein Halogen wie Chlor Brom oder Jod bedeutet und R eine Amino- oder Hydroxygruppe und die Reste R_1 und R_2 gleich oder verschieden und jeder dieser beiden Reste unabhängig voneinander eine Niedrigalkylgruppe oder

oder Wasserstoff ist, und isoliert die so gebildete Verbindung.

In diesem Verfahren unterwirft man eine Verbindung des Typs (II) einer Cyclisierungsreaktion mit einem Halogenhydroxyaceton-derivat (III), wobei R, R₁, R₂ und Hal die vorgenannten Bedeutungen haben. Verbindungen der Formeln (II) und (III) können mittels bekannter Standardreaktionen hergestellt werden.

Unter der verwendeten Bezeichnung "Niedrigalkylgruppe" ist eine gerade Alkylgruppe zu verstehen, die 1 bis 3 Kohlenstoffatome hat.

Die neuen Verbindungen und ihre Salze inhibieren eines der Enzyme, die bei einer Biosynthese der Dihydrofolsäure von Bedeutung und daher für das Wachstum von Mikroorganismen, z. B. Bakterien, essentiell sind. Die neuen Verbindungen können deshalb in pharmakologischen Untersuchungen in vitro, in klinischen und diagnostischen Untersuchungen, die beispielsweise die Eigenschaften von Bakterien betreffen, verwendet werden. Wenn sie als Bakteriostatika verwendet werden, verursachen die Verbindungen eine Reduktion der Vermehrung von Mikroorganismen bei einer Konzentration von 100 µmol/l.

Es wurde außerdem gefunden, daß diese Verbindungen synergistisch sowohl mit Sulfonamiden als auch mit Dihydrofolsäurereduktasehemmern vom Typ des

2,4-Diamino-5-(3',4',5'-trimethoxybenzyl)-pyrimidins (TMP) sowie deren Kombination wirken können. Die starke wechselseitige Potenzierung der antibakteriellen Wirkungen ist Folge einer sequentiellen Blockade der Folsäurebiosynthese. Der Bereich der durch solche Kombinationen ausgeübten antimikrobiellen Wirkung ist beträchtlich größer als er aus der Aktivität von einer der Drogen zu erwarten war.

0051852

Organismen, die nur gering gegen die einzelnen Mittel empfindlich sind, werden bzw. sind gegenüber diesen Kombinationen hoch empfindlich. Die Resistenzentwicklung wird deutlich verzögert. Die Mikrobeninfektionen, gegen die diese Kombinationen wirksam sind, sind Infektionen, die von solchen Bakterien verursacht werden, die wenigstens einen wesentlichen Teil ihres Tetrahydrofolat-Kofaktorbedarfs bilden. Im besonderen sind diese infizierten Mikroorganismen solche, die ausreichend die hier beschriebenen Kombinationen absorbieren und in denen diese Kombinationen eine synergistische Wirkung in der Weise ausüben, daß sie die "de novo"-Synthese der benötigten Tetrahydrofolat-Kofaktoren beeinträchtigen bzw. unterbinden.

Es wurde im besonderen gefunden, daß, wenn Verbindungen der Formel (I) - Fig. 1 - mit einer Menge eines Sulfonamids und/oder eines Hemmstoffs vom Typ des 2,4-Diamino-5-(3',4',5'-trimethoxybenzyl)-pyrimidins (TMP) kombiniert werden, die als solche gewöhnlich nicht ausreichend ist, als antimikrobielles Mittel wirksam zu sein, die Kombination einer Verbindung der Formel (I) mit dieser normalerweise nicht wirksamen Menge des Sulfonamids und/oder des Hemmstoffs vom Typ des genannten Pyrimidins (TMP) eine Mischung bildet, die als wirksames Mittel gegen Mikroben wirkt. Dies ist besonders dann von Bedeutung, wenn die Menge der Verbindung der Formel (I) so gering ist, daß sie im wesentlichen bei der gegebenen Menge keine Mikrobewirkung hat, aber in der Kombination eine Potenzierung eintritt, die in einigen Fällen sehr stark ist. Es ist daher unter Verwendung einer wirksamen potenzierenden Menge einer Verbindung der Formel (I) zusammen mit dem Sulfonamid und/oder dem DHF-Reduktase-Hemmstoff vom Typ des erwähnten Pyrimidins (TMP) möglich, die Menge des

Sulfonamids und/oder des DHF-Reduktase-Hemmstoffs vom Typ des erwähnten Pyrimidins (TMP), die zur Inhibierung des Wachstums dieser Bakterien erforderlich ist, wesentlich zu verringern.

Entsprechend den vorausgegangenen Ausführungen bedeutet die Bezeichnung "eine wirksame Menge", soweit sie in Verbindung mit den Bezeichnungen "DHF-Reduktase-Hemmstoff vom Typ des

2,4-Diamino-5-(3',4',5'-trimethoxybenzyl)-pyrimidins (TMP)"

und "Sulfonamid" verwendet wird,

entweder (a) eine Menge des DHF-Reduktasehemmers vom Typ des

2,4-Diamino-5-(3',4',5'-trimethoxybenzyl)-pyrimidins (TMP)

oder Sulfonamids, die zu einem gewissen Grad als Mittel gegen

Mikroben wirksam ist, die aber durch die Verwendung einer Verwendung einer Verbindung der Formel (I) potenziert wird,

oder (b) eine Menge DHF-Reduktase-Hemmstoff vom Typ des

2,4-Diamino-5-(3',4',5'-trimethoxybenzyl)-pyrimidins (TMP) oder

Sulfonamid, die als Mittel gegen Mikroben nicht wirksam ist,

die aber, wenn sie mit einer Verbindung der Formel (I) kombiniert

wird, eine Zubereitung bildet, die ein wirksames Mittel gegen Mikroben ist.

Unter einer "wirksamen potenzierenden Menge" ist eine Menge der Verbindung der Formel (I)-Fig. 1 - zu verstehen, die die Wirk-

samkeit eines DHF-Reduktase-Hemmstoffs vom Typ des

2,4-Diamino-5-(3',4',5'-trimethoxybenzyl)-pyrimidin und/oder

Sulfonamids so erhöht, daß eine verbesserte oder ausreichende

Wirksamkeit für die gesamte Kombination erreicht wird.

Die Verhältnisse, in denen die antimikrobiell wirksamen Verbin-

dungen der Formel (I) in den hier beschriebenen Kombinationen

verwendet werden, können in weiten Grenzen variieren. Abhängig

von der Natur und den Umständen der Verwendung, können Mischungen der Verbindungen der Formel (I) zusammen mit dem Sulfonamid und/oder dem DHF-Reduktase-Hemmstoff vom Typ des erwähnten Pyrimidins mit entsprechenden Anteilen und Dosierungen gewählt werden.

Die potenzierende Wirkung der Verbindungen der Formel (I) kann in vitro relativ leicht durch den Röhrchenverdünnungstest (MHK) und/oder bakterienkinetische Untersuchungen gezeigt werden.

Im folgenden wird ein Ausführungsbeispiel der Erfindung beschrieben:

2-Amino-4-hydroxy-5-nitro-6-mercaptopyrimidin (II; R=OH)

(1.59g $\hat{=}$ 10mmol) wurde bei Raumtemperatur unter Stickstoff in 100 ml wasserfreiem Methanol, welches 440 mg Natriumhydroxyd ($\hat{=}$ 11 mmol) enthielt, unter Rühren gelöst. Zur resultierenden hellgelben Lösung wurde eine Lösung von

1-hydroxy-3-jodpropanon-(2)(III; R₁=R₂=H, Hal=J) (2,2g $\hat{=}$ 11 mmol) in 100 ml Methanol während einer Stunde hinzuge tropft und die erhaltene Mischung zwei weitere Stunden unter Stickstoff gerührt.

Dann wurde vom Ausgefallenen abfiltriert, das Filtrat mit einem halben Tropfen Eisessig neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum weitgehend entfernt. Die ausgefallene gelbe Substanz wurde abfiltriert, mit Methanol gewaschen und im Vakuum über Phosphor-pentoxyd getrocknet. Die Ausbeute des so erhaltenen neuen Stoffs 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7H-pyrimido [4,5b][1,4]thiazin (I; R=OH, R₁=R₂=H)

betrug 1.1g $\hat{=}$ 51.9 %, der Schmelzpunkt 300°C.

Weitere erfindungsgemäße Verbindungen können analog zum beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

Potentielle Folsäureantagonisten der Formel (I) und Kombinationen derselben mit Sulfonamiden und/oder DHF-Reduktase-Hemmstoffen vom Typ des

2,4-Diamino-5-(3',4',5'-trimehoxybenzyl)-pyrimidins (TMP) können auf ihre eigene und in Kombination potenzierte antimikrobielle Wirkung mit Hilfe der Bakterienvermehrungskinetik wie folgt geprüft werden:

Es werden zu Bakterienkulturen (Beispiel E.coli) in der logarithmischen Wachstumsphase die genannten Inhibitoren allein oder in den oben beschriebenen Kombinationen hinzugefügt. Die Veränderung der Zahl der Bakterien als Funktion der Zeit wird mit einem Coulter Counter (Gesamtkeimzahl) bzw. mit Hilfe der Kolonienzählung (Plattentest, Lebendkeimzahl) ermittelt. Die Vermehrungskurven werden bei Abwesenheit und bei Anwesenheit der Hemmstoffe und ihrer oben beschriebenen Kombinationen ermittelt. Die aus ihnen ermittelten Änderungen in den Vermehrungsgeschwindigkeiten sind ein Maß für die antibakterielle Wirkung.

Die Figur 2 der Zeichnung zeigt:

Typische Vermehrungskurven von E.coli(mutaflor)(Temperatur: 37°C, Nährflüssigkeit: modifizierter Sauton) in Gegenwart von 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7H-pyrimido [4,5b][1,4]thiazin (I, R = OH, R₁ = R₂ = H)(PTZ), Sulphisoxazol(SMZ) und Trimethoprim (TMP) allein und in Kombinationen wie oben beschrieben. TMP wurde 1,5 Stunden später als die anderen Verbindungen der Kultur zugesetzt. Die Kurven (Symbol), Hemmstoffkonzentrationen (µmol/l) und beobachtete Vermehrungsgeschwindigkeitskonstanten k_{beob.} (10⁴ sec⁻¹) waren:

1. Coulter Counter (Gesamtkeimzahl)

(x) 0.0 SMZ, 0.0 PTZ, 0.0 TMP, 3.94; (●) 2.0 SMZ, 0.0 PTZ, 0.0 TMP, 1.06; (o) 0.0 SMZ, 75.0 PTZ, 0.0 TMP, 3.82; (Δ) 0.0 SMZ, 0.0 PTZ, 0.4 TMP, 0.72; (▲) 2.0 SMZ, 75.0 PTZ, 0.0 TMP, 0.58; (□) 2.0 SMZ, 0.0 PTZ, 0.4 TMP, 0.0; (▽) 0.0 SMZ, 75.0 PTZ, 0.4 TMP, 0.12; (▼) 2.0 SMZ, 75.0 PTZ, 0.4 TMP, 0.0.

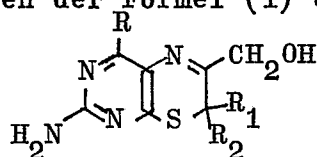
2. Plattentest (Lebendkeimzahl)

(◇) 2.0 SMZ, 0.0 PTZ, 0.4 TMP, - 0.67; (■) 0.0 SMZ, 75.0 PTZ, 0.4 TMP, -0.11; (◆) 2.0 SMZ, 75.0 PTZ, 0.4 TMP, -0.43.

Pyrimido[4,5b][1,4]thiazine und Verfahren
zu ihrer Herstellung.

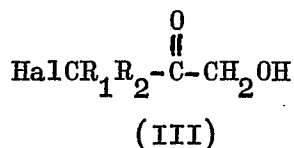
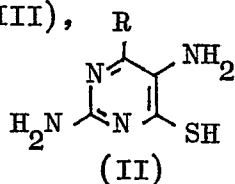
Patentansprüche:

1. Verbindungen der Formel (I) oder eine tautomere Form derselben,



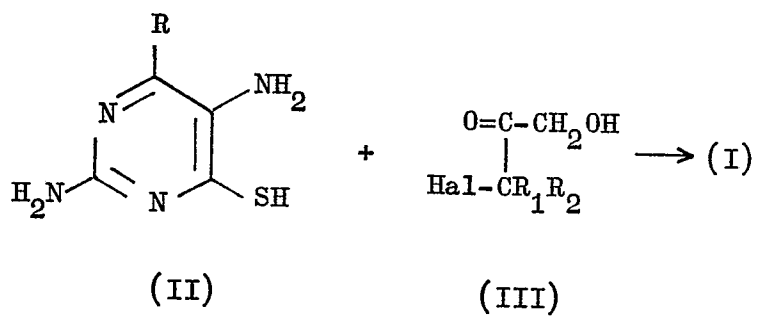
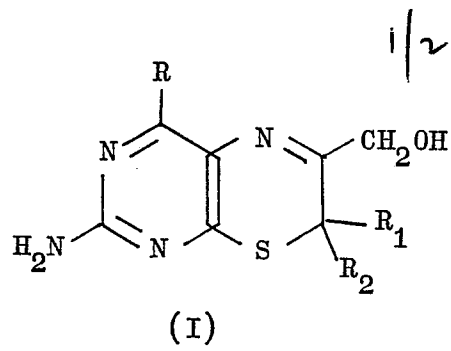
worin R eine Amino- oder Hydroxygruppe und die Reste R_1 und R_2 gleich oder verschieden und jeder dieser beiden Reste unabhängig voneinander eine Niedrigalkylgruppe oder Wasserstoff ist.

2. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel (I) oder eines Salzes dieser Erfindung, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der Formel (II) umsetzt mit einer Verbindung der Formel (III),

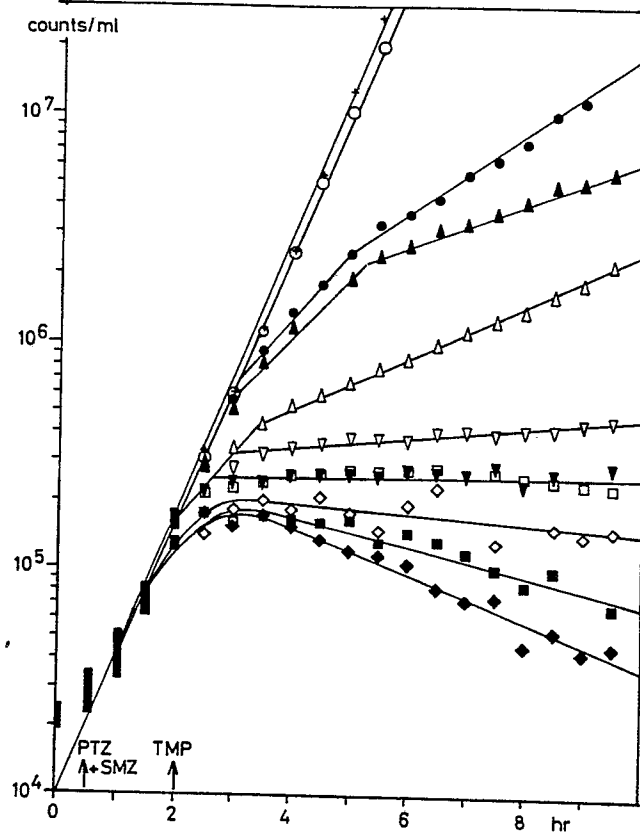


wobei Hal ein Halogen wie Chlor, Brom oder Jod bedeutet und die Reste R, R_1 und R_2 die in Anspruch 1 definierte Bedeutung haben, und die so gebildete Verbindung (I) isoliert.

3. Die Anwendung der Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 1 in Mischungen mit Sulfonamiden und/oder Dihydrofolsäurereduktase-Hemmstoffen vom Typ des 2,4-Diamino-5-(3-,4-,5--trimethoxybenzyl)-pyrimidins als Kombination in pharmazeutischen Präparationen.



Figur 1



Figur 2



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0051852

Nummer der Anmeldung

EP 81 10 9501

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
	FR - A - 2 181 827 (VSESOJUZNY NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKY) * Anspruch 1 * -----	1,3	C 07 D 513/04 A 61 K 31/54 31/18 31/505// (C 07 D 513/04 277/00 239/00) RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.) C 07 D 513/00 A 61 K 31/00 KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: mchtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde lie- gende Theorien oder Grund- sätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen ange- führtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patent- familie, übereinstimmendes Dokument
	Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
Den Haag	04.02.1982	ALFARO	